钙库调控的钙通道 Orai1 体外研究方法的建立*

武福云 [1,2] 姚美连 [2] 吴胜英 [2] 汪雄 [2] 李珊 [2**]

（1 湖北医药学院附属随州中心医院 随州 441300）

（2 湖北医药学院基础医学院 十堰 442000）

摘要 目的：建立钙通道 Orai1 的体外研究方法。方法：利用脂质体重组技术，将体外纯化的 Orai1 蛋白重组到脂质体膜上，并利用蔗糖密度梯度离心来检测其重组效率及 Orai1 蛋白在脂质体膜上的结构，并利用钙染料 Fura-2 检测脂质体内钙离子的释放。结果：成功制备了脂质体及体外纯化了 GST-Orai1 融合蛋白，蔗糖密度梯度离心结果证明 GST-Orai1 蛋白成功重组到脂质体上，以及 Orai1 蛋白以多聚体的形式定位在脂质体膜上。钙离子释放实验证明脂质体内钙离子包装完好，可用于后续 Orai1 钙通道的功能研究。结论：利用脂质体重组技术建立了一种新的 Orai1 的研究方法，能够更直接有效地研究其功能及其活化机制。

关键词 钙通道 Orai1 蛋白 体外研究

中图分类号 Q71;Q73

Establishment of an In Vitro Method to Study Store-Operated Calcium Channel Orai1

WU Fu-yun[1, 2] YAO Mei-lian[2] WU Sheng-ying[2] WANG Xiong[2] LI Shan[2**]

（1 Suizhou Central Hospital, Hubei University of Medicine, Suizhou, Hubei 442000, china）

(2 College of Basic Medicine, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, china)

Abstract Objective: to establish an in vitro method of calcium channel Orai1. Methods: the purified Orai1 protein was reconstituted into liposome membrane by the liposome reconstitution technology, and the recombinant efficiency and the structure of Orai1 protein on the liposome membrane were detected by sucrose density gradient centrifugation, and the release of calcium in the liposome was detected by calcium dye Fura-2. Results: the liposomes were successfully prepared and the GST-Orai1 fusion protein was purified in vitro. The sucrose density gradient

---

* *国家自然科学基金(No.81702639，No.81502637)；湖北省自然科学基金(No. 2016CFB240)资助项目

** 通讯作者，电子信箱: 34141003@qq.com

centrifugation showed that the GST-Orai1 protein was successfully reconstituted into liposomes, and the Orai1 protein was located on the liposome membrane in the form of polymer. Calcium release experiments showed that calcium ions were loaded into the liposomes and could be used for functional study of Orai1 calcium channels. Conclusion: a new method of Orai1 was established to study its function and activation mechanism more directly and effectively.

Key words calcium channel Orai1 protein in vitro

钙离子作为细胞内重要的信号分子，几乎参与了所有的细胞生命活动，如基因转录、细胞分泌、能量代谢和细胞的增殖分化及凋亡等[1]。而钙离子作为信号分子的基础在于胞内钙离子与胞内钙库或胞外钙离子之间存在浓度梯度。细胞内钙离子浓度的变化与多种疾病的发生密切相关，因此钙离子信号受到了非常严格的调控[2]。

Orai1是一个非常重要的介导钙离子信号的通道，Orai1介导的钙内流是非兴奋细胞内最主要的钙离子进入细胞的方式，称为钙库调控的钙内流（SOCE)，即Orai1介导的钙内流受到内质网钙离子浓度的调节。SOCE的两个主要功能蛋白包括Orai1和STIM1，Orai1是定位在细胞膜上的四次跨膜蛋白，由四个穿膜的α螺旋（TM1-4）、三个连接穿膜区的环状结构域及暴露在胞浆内的N端和C端组成[3]，如图1A。目前，果蝇Orai蛋白的空间结构已经得到解析，果蝇Orai蛋白会形成六聚体，六个TM1形成了中间的离子通道[4]。STIM1蛋白是定位在内质网上的单次跨膜蛋白，其N端有两个EF-hand结构域，能够感受钙离子浓度变化[5]。如当G蛋白和酪氨酸激酶受体活化磷酸酶C（PLC）后，质膜上特异的磷脂 PIP_2 被水解，形成 IP_3，IP_3 快速与内质网上的 IP_3 受体通道结合使得内质网钙离子释放，STIM1蛋白二聚化，并迁移到内质网与质膜接触位点，STIM1的SOAR结构域与Orai1的C端和N端相互作用，从而激活Orai1钙通道[6]。Orai1的活化参与了细胞的多种生命活动，同时Orai1也被发现与多种疾病密切相关，如通道失活型突变Orai1 R91W 能引起严重的免疫缺陷综合征[7]。Orai1缺陷能够导致心衰及骨骼肌无力[8]，Orai1也被发现参与了多种肿瘤的发生发展,如乳腺癌、前列腺癌和结肠癌等[9-12]。因此Orai1活化机制的阐明及其功能的研究对于多种疾病的治疗将有重要意义。

脂质体是一种人工制备的，具有双分子层结构的小囊泡，具有双亲性，因此被广泛地应用于药物的靶向传递，生物大分子的载体等[13]。脂质体重组技术则被应用于研究膜蛋白的功能。膜蛋白作为一类非常重要的蛋白，直接参与物质运输、信号转导等。脂质体重组技术能够很好地模拟膜蛋白所处的脂质环境，排除了复杂细胞内环境的干扰，能够更好地研究其功能[14-15]。钙通道Orai1作为一个非常重要的离子通道，尽管其功能已经得到了广泛地研究，但细胞内其他分子的影响却无法被排除。将Orai1蛋白纯化并重组到脂质体，来研究其结构及功能，能够很好地排除细胞内复杂的环境，更直接地研究其相互作用蛋白、通道的活化机制以及Orai1钙通道相关药物的筛选。因此，我们利用脂质体重组技术制备了Orai1脂蛋白复合体，如图1B。

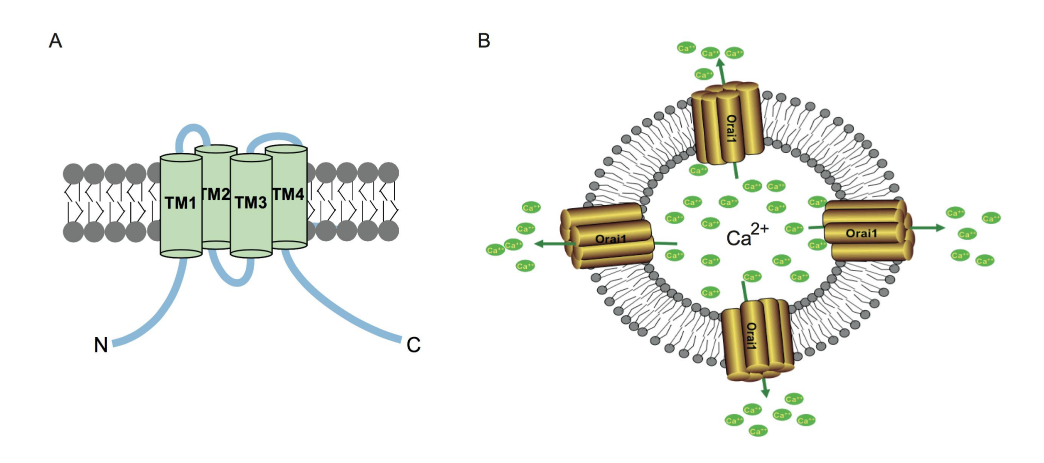


图1 Orai1蛋白的结构模式图及体外重组示意图

Fig 1. Model of Orai1 reconstitution in liposome.（A）Schematic diagrams of membrane topology of Orai1. （B）Schematic diagrams of Orai1 in proteoliposomes.

1 材料与方法

1.1 主要材料

DNA 聚合酶，限制性内切酶，T4 DNA 连接酶购于 Thermo fisher scientific 公司，感受态细胞购于 TransGen Biotech，Fura-2（Invitrogen），Ionomycin（EMD Chemicals），蛋白纯化的 GSH beads（GE healthcare），用于脂质体制备的脂肪 POPC/POPS 购于 Avanti 公司，Bio-bead SM 吸附珠（Bio-rad），3C Protease 和 HA 抗体（Sigma-Aldrich）。

1.2 方法

1.2.1 脂质体的制备

将溶解于氯仿的三种脂肪，磷脂酰胆碱（POPC）、磷脂酰丝氨酸(POPS)和和罗丹明标记的磷脂酰磷脂酰乙醇胺(Rho-PE)按照表 1 的比例混匀，总脂肪含量为 10mmol/L，用氮气小心吹干，然后用真空浓缩仪抽真空 1h，进一步去除多余的氯仿。将吹干的脂肪用缓冲液（25mmol/L Hepes，100mmol/L KCl）溶解，并用液氮反复冻融 10 次，水化过程中脂肪形成多层多室的脂质体。得到的多层多室脂质体经 Mini-Extruder 脂质体挤出仪微孔滤膜来回挤压，最终形成单层的大单室脂质体（LUV），最后用荧光显微镜观察制备的脂质体。

表 1 脂质体的成分及比例

Table 1. Composition and proportion of liposomes

脂肪种类	摩尔比例
POPC	83.5%
POPS	15%
Rho-PE	1.5%

1.2.2 分子克隆及 Orai1 蛋白表达纯化

通过 PCR 的方法扩增 Orai1 基因序列，酶切连接，亚克隆到 pGEX-6P-1 载体，并在 Orai1 序列 C 端加入 HA 标签序列。带有 GST 和 HA 标签的 Orai1 蛋白通过大肠杆菌体外诱导表达。含有 Orai1 表达载体的大肠杆菌在 LB 培养基，37℃振荡培养至 OD600 等于 0.8 后，加入终浓度 0.5mM 的 IPTG，24℃诱导 12h。离心收集菌体并超声破碎，通过超速离心 32,000 rpm，30min 得到膜组分，然后加入含有 2% Triton-X100 的缓冲液抽提膜蛋白，离心得到含有膜蛋白 GST-Orai1 的上清，经过 Glutathione sepharose beads 纯化后，用含有 10mM 还原型谷胱甘肽及 0.1% Triton 的缓冲液洗脱，并经分子筛纯化后，浓缩到 1mg/ml 用于后续实验。

1.2.3 Orai1 蛋白重组到脂质体

将纯化的 GST-Orai1 融合蛋白与脂质体按 1:1000 的摩尔比混合，然后加入含有 Ca^{2+}的缓冲液，使 Ca^{2+}的终浓度为 200μmol/L，室温孵育 5min，随后加入 Bio-beads SM-2 珠子，每隔 1h 加一次，共加 5 次，用于吸附体系中的 Triton-X100，从而使膜蛋白 Orai1 重组到内含钙离子的脂质体上。14000g 离心 10min，取上清即为重组好的脂质体，用于后续实验。

1.2.4 蛋白脂质体重组效率的检测

将 30μL 重组好的 Orai1 蛋白脂质体或单独的 Orai1 蛋白作为对照与 100μL 1.9mol/L 蔗糖混合置于离心管底部，向上依次加入 100μL 1.25mol/L 蔗糖和 20μL 缓冲液，制备成蔗糖密度梯度。用贝克曼离心机 TLS55 转子 54000rpm 离心 1h，从上到下将样品分为 5 份，每份 50μL。各取 15μL 进行 Western Blot 检测。

1.2.5 Orai1 蛋白在脂质体朝向的检测

取 20ul 重组好的 Orai1 蛋白脂质体加入 1uM 的 3C 蛋白酶，4℃酶切过夜。加入上样缓冲液，SDS-PAGE 后，Western Blot 检测。

1.2.6 体外钙离子释放实验

将重组好的脂质体超速离心 54000rpm，30min 进行沉淀，去上清并用没有钙离子的缓冲液进行重悬，从而去除体系内残留的钙离子，加入 Fura-2，使其终浓度为 50μmol/L，加入 2uM 钙离子载体 ionomycin 释放脂质体内的 Ca^{2+}，用酶标仪检测 Fura-2 在 340nm/380nm 激发、510nm 下的发射值，来检测溶液中的钙离子浓度。

1.2.7 Orai1 蛋白在脂质体上的结构检测

30ul 重组好的 Orai1 蛋白脂质体分别加入 1%的去垢剂 SDS 和 Digitonin，4℃孵育 1h 后，轻轻加到 5-25%(wt/vol)的蔗糖梯度上，用贝克曼离心机 TLS55 转子 174,000 g，离心 2 h，从上到下分成 14 份，每份取 15ul 进行 Western Blot 检测。

2 结果

2.1 脂质体的制备

利用反复冻融的方法制备完成的脂质体含有荧光染料罗丹明，荧光显微镜观察结果显示，脂质体制备成功。如图 2。

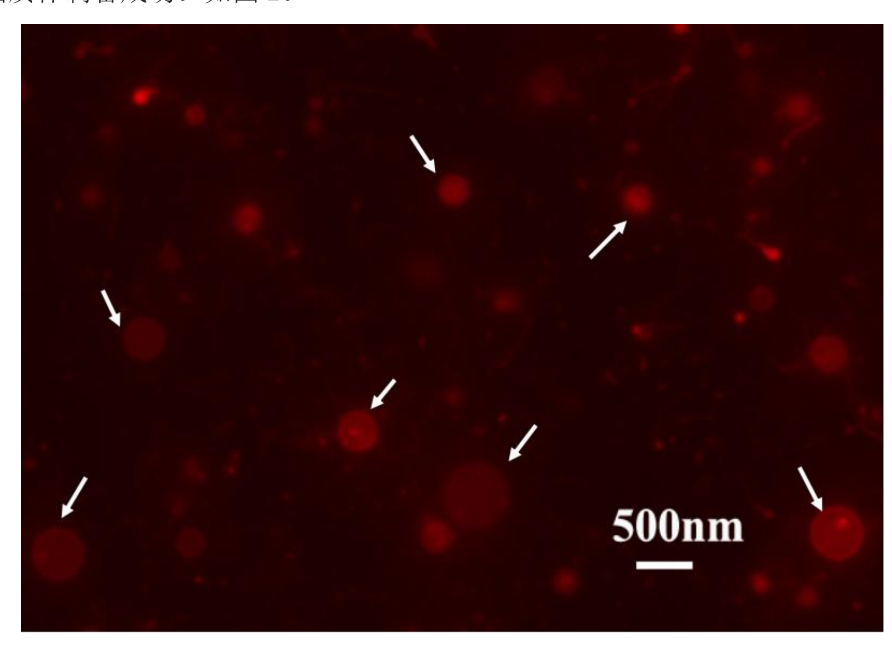


图2 制备的脂质体

Fig 2. Rhodamine labeled liposomes（Arrows indicate the liposome）

2.2 Orai1 基因的表达载体构建及蛋白的表达纯化

通过 PCR 的方法从人的 cDNA 序列扩增得到 Orai1 基因片段，如图 3A。通过酶切连接的方法将 Orai1 基因插入到原核表达载体 pGEX-6P-1，通过双酶切验证，确认载体构建成功，如图 3B。并经公司测序后，转化 BL21 感受态，诱导表达蛋白。

钙通道 Orai1 蛋白是定位在细胞质膜上的膜蛋白，因此其纯化相对于可溶性的胞浆蛋白更困难。通过构建原核表达载体 pGEX-6p-1-Orai1，在大肠杆菌内表达 GST-Orai1 融合蛋白，用去垢剂 Triton X-100 从细胞膜上抽提出 GST-Orai1 融合蛋白，最后通过结合 GST 标签蛋白的琼脂糖凝胶将融合蛋白纯化，并通过分子筛 superdex200 进一步纯化，得到目的蛋白。如图 3C。

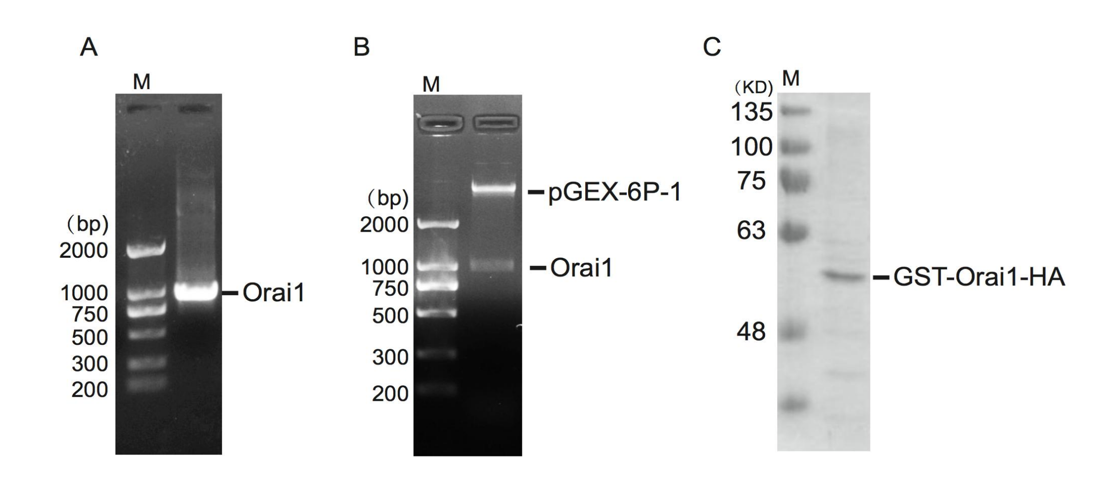


图 3 Orai1 的原核表达载体构建和蛋白表达纯化

Fig 3. Plasmid construction, protein expression and Purification of Orai1

（A）Amplification of Orai1 gene （B）Double digestion of plasmid pGEX-6P-1-Orai1（C）Purification of Orai1 proteins

2.2 Orai1 蛋白脂质体重组效率检测

为了在体外直接研究钙通道 Orai1 的功能，我们通过制备脂质体来模拟细胞，并将 GST-Orai1 蛋白重组到脂质体上，并通过漂浮实验来检测重组效率，即将重组好的 Orai1 脂蛋白体铺在蔗糖密度梯度的底层，通过超速离心检测 Orai1 蛋白能否和脂质体一起漂浮到蔗糖梯度的最顶层，并用纯化的 GST-Orai1 融合蛋白作为对照。如图 4A。从实验结果我们可以看出，GST-Orai1 蛋白与脂质体重组过后能够很好地漂浮到蔗糖梯度的顶层，而 GST-Orai1 蛋白则不能漂浮到最上面，而是沉积在蔗糖梯度下部。该结果表明 Orai1 融合蛋白成功重组到脂质体上，如图 4B。

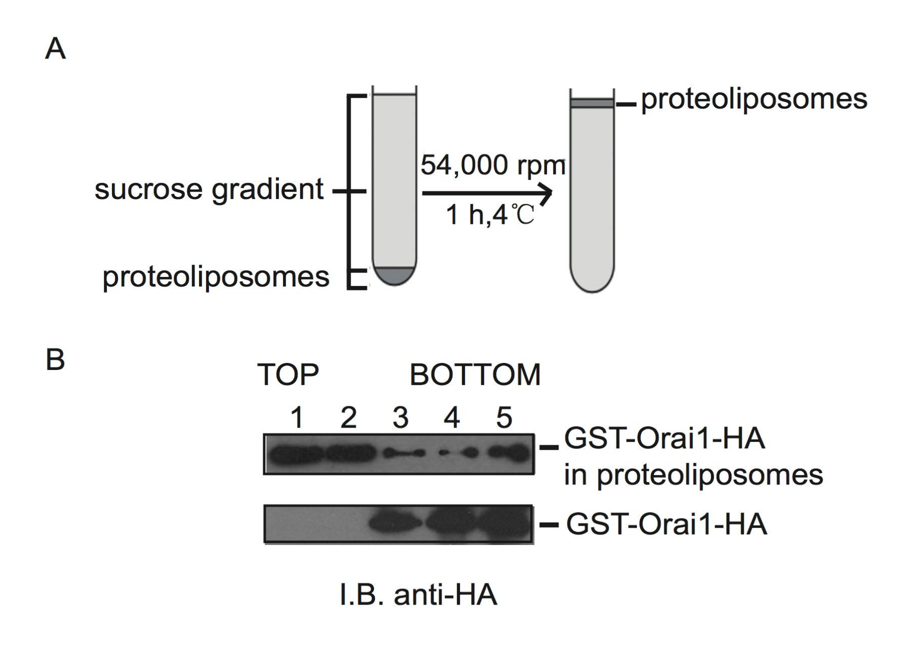


图 4 Orai1 蛋白重组到脂质体上

Fig 4. Orai1 reconstitution in liposomes. （A）A modal of sucrose gradient centrifugation to detect reconstitution efficient （B）GST-Orai1 were reconstituted into liposomes. Flotation in a sucrose gradient indicated efficient reconstitution of the proteins，five fractions from top to bottom were detected by western blot

2.3 Orai1 蛋白在脂质体上的朝向检测

Orai1 蛋白在细胞膜上的方向是，N 端和 C 端在细胞内参与蛋白质的相互作用，从而被活化，钙离子从胞外流向胞内。因此我们需要检测脂质体上 Orai1 的方向。利用 Orai1 融合蛋白 N 端和 C 端的两个标签 GST 和 HA，通过酶切实验可以来检测。如果 Orai1 的定位如图 5A 所示，N 端和 C 端定位在脂质体外，则 3C 酶可以切掉 GST 标签。实验结果表明

GST-Orai1 蛋白脂质体可以被 3C 酶切掉 GST 标签，分子量变小，如图 5B。说明 Orai1 钙通道的 N 端和 C 端在脂质体外，钙离子的流动方向应该是由内到外。所以我们应该把钙离子放在脂质体内。

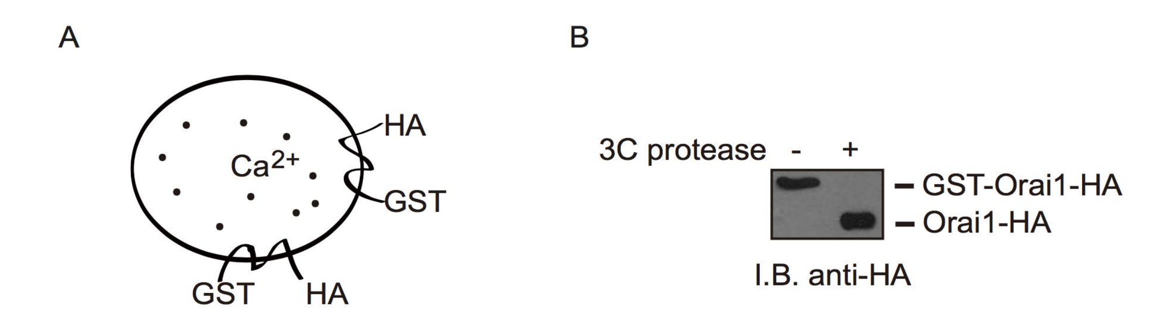


图 5 Orai1 蛋白在脂质体上的朝向检测

Fig 5. Orientation of Orai1 in liposomes. （A）A diagram of the orientation of Orai1 proteins in the liposomes（B）The orientation of Orai1 proteins in the liposomes was measured by 3C protease. After 3C protease treatment， the Orai1 protein in the proteoliposomes was detected by western blot

2.4 Orai1 蛋白脂质体钙离子释放实验

通过加入离子霉素（ionomycin）检测脂质体内的钙离子的包装情况。离子霉素可以使脂质体内的钙离子释放，加入钙离子染料 Fura-2，检测 340nm 和 380nm 激发的荧光强度的比值，如图 6。结果显示，离子霉素可以使脂质体内钙离子释放，说明脂质体内钙离子包装完好。可以用于后续实验。

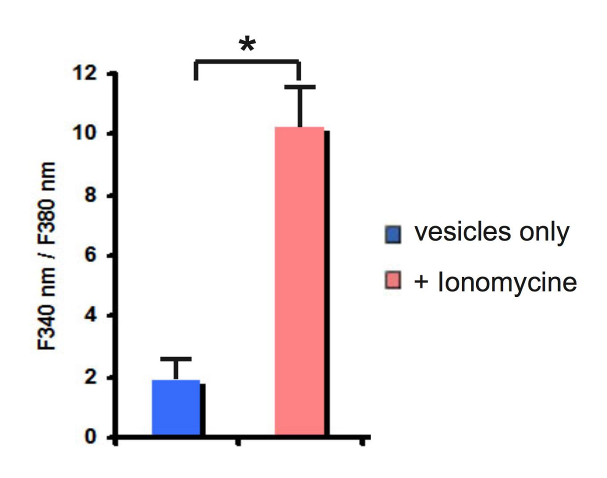


图 6 Orai1 脂蛋白体钙释放实验

Fig 6. Encapsulation of calcium in liposomes. Calcium ion was loaded in Proteoliposomes containing GST-Orai1-HA， then Fura-2 was used to detected calcium release from liposomes with or without ionomycine（*p<0.05, n=3）.

2.5 Orai1 的结构与功能检测

通过漂浮及酶切实验，我们确定了 Orai1 的重组效率及朝向，为了进一步检测 Orai1 能否形成多聚体，发挥其钙通道的功能。通过将 Orai1 蛋白脂质体利用两种去垢剂 SDS 和 Digitonin 来溶解，检测 Orai1 在脂质体上的聚合状态。SDS 是强的离子型去垢剂，能够使蛋白质多聚体解聚，而 Digitonin 是一种弱的去垢剂，能够将蛋白从膜上溶出，而保持其多聚体的结构。将溶解后的蛋白脂质体通过蔗糖密度梯度离心，从上到下分成 14 个组分，利用蛋白标准品确定蔗糖梯度不同位置的分子量。如图 7。western-blot 检测发现经 SDS 处理后，Orai1 蛋白主要集中在上面的组分，而经过弱的去垢剂 Digitonin 处理后，Orai1 蛋白主要集中在下面的组分，说明 Orai1 蛋白能够在脂质体上形成多聚体的结构来发挥功能。

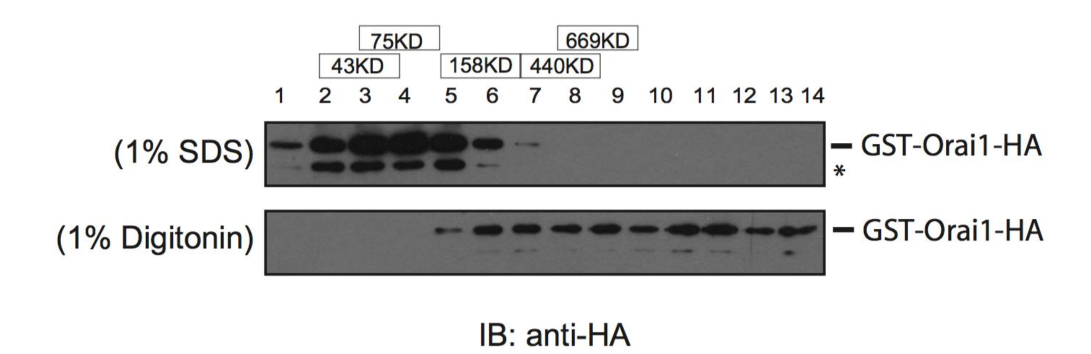


图 7 Orai1 蛋白在脂质体上的结构

Fig 7. Orai1 forms oligomers in liposomes. Proteoliposomes containing GST-Orai1-HA were solubilized in 1% SDS or 1% Digitonin and the extracts were subjected to sucrose gradient centrifugation. Fractions were analyzed by SDS/PAGE and Western blot with antibodies to HA. Molecular mass standards in the sucrose gradient are indicated. Asterisk (*) indicates a degraded band.

3 讨论

膜蛋白在细胞的各种生命活动中，发挥着重要的作用，如物质运输、信号转导、催化反应及膜塑形等。膜蛋白在整个蛋白质组中约占 20%-30%，其中 60%的膜蛋白被作为药物的靶点，因此膜蛋白的生理功能需要更加深入地研究。但是由于膜蛋白镶嵌在膜上，受到膜脂及细胞内复杂环境的影响，如细胞内复杂的代谢途径及蛋白质之间的相互作用，直接地研究其功能不是太容易[16]。尽管利用一些生物物理及生物化学的方法可以将膜蛋白从膜上分离进行研究，但是脱离膜脂的环境，膜蛋白很难维持其正常的结构及生理功能。脂质体重组技术是一项非常具有创新性的研究膜蛋白生理特性及功能的技术。其优点在于可以在体外相似的脂质环境下研究膜蛋白，以及可以包被一些小分子来研究膜蛋白的跨膜转运等功能。

钙库调控的钙通道 Orai1 是定位在质膜上，且是非兴奋细胞内主要的钙内流的通道，因此 Orai1 直接与多种生理功能相关，阐明其通道的活化机制至关重要。因此，我们希望通

过脂质体重组技术建立起 Orai1 的体外研究体系。首先我们在体外制备了脂质体，如图 2，并表达纯化了 Orai1 融合蛋白 GST-Orai1-HA，如图 3C。膜蛋白纯化相对胞浆蛋白更困难，需要利用弱的去垢剂来从膜上抽提。我们尝试了多种去垢剂 Triton X-100、DM、DDM、OG、LDAO 等，最终选择 Triton X-100 来抽提膜蛋白。并利用 GST 亲和层析和分子筛纯化了 Orai1 蛋白。膜蛋白一旦脱离了稳定其结构的脂质环境，很容易变性沉淀。将 Orai1 蛋白和脂质体按照一定比例混匀，逐渐去除去垢剂完成膜蛋白的重组。利用蔗糖密度梯度离心可以来检测膜蛋白是否重组到了脂质体上。重组好的蛋白脂质体密度会变小，在离心的过程中会飘到蔗糖梯度的最上层，如图 4B。膜蛋白插入脂质体的朝向同样是需要检测及控制的因素。如利用荧光淬灭实验可以检测偶联有荧光基团膜蛋白蛋白重组到脂质体上的朝向。如果荧光基团在脂质体内，则荧光不能被淬灭剂淬灭，这样就可以判断膜蛋白的朝向，这关系到了膜蛋白发挥物质转运、离子通道或者化学反应的方向[17]。本研究表达纯化的融合蛋白 GST-Orai1，在 GST 标签蛋白和 Orai1 蛋白之间具有 3C 酶的酶切位点，因此通过酶切实验可以检测 Orai1 重组后的朝向。GST 标签可以被切除，如图 5B，说明 Orai1 的 N 端和 C 端暴露在脂质体外，钙离子应该从脂质体由内向外流动。所以我们在重组的体系中加入了钙离子，当重组完成后，钙离子被包被到脂质体内。利用离子霉素释放脂质体内钙离子，并用钙离子荧光染料 Fura-2 来检测，如图 6。说明脂质体包装钙离子完好。体外表达纯化的 Orai1 是否能够正常的发挥其功能，取决于其是否能够形成寡聚体组装成钙离子通道。果蝇 Orai 形成六聚体组成钙离子通道，但人类的 Orai1 蛋白结构还没有得到解析，而且一些生化实验证明四聚体的 Orai1 具有更高的钙离子选择性，这与内源性的钙库调控的钙通道特性一致[18]，所以 Orai1 到底形成几聚体还有待其结构的解析。但可以肯定的是 Orai1 需要形成寡聚体，由其第一个跨膜区组成钙离子通道。因此，我们利用两种去垢剂 SDS 和 Digitonin 的不同特性，分别来溶解脂质体，SDS 会使蛋白解聚变性，Digitonin 是相对温和的去垢剂，可以保持蛋白的寡聚状态。蔗糖密度梯度离心可以区分不同寡聚状态的 Orai1 蛋白，如图 7，说明 Orai1 在脂质体上能够形成寡聚体，可以发挥钙通道的功能。

综上所述，通过我们的方法，能够很好地将钙通道 Orai1 从细胞膜转换到了类似环境的脂质体膜上，同时又脱离了复杂的细胞内环境，这样将有利于直接研究其相互作用蛋白，如与 STIM1 和钙调蛋白的相互作用机制，作用区域和作用位点；有利于阐明其活化机制，如 Orai1 钙通道是否能够被 STIM1 直接激活；有利于研究 Orai1 的重要位点，如我们可以重组 Orai1 突变体蛋白 R91W 来研究其活化机制；有利于针对 Orai1 钙通道抑制剂及激活剂的研究和开发，如 2-APB，SKF-96365 及其他小分子的机制研究。总之，本研究为钙库调控的钙通道 Orai1 的研究建立了一种新的方法，同时也为其他膜蛋白的研究提供了新的思路。

参考文献

[1] Clapham DE. Calcium signaling. Cell, 2007,131(6): 1047-1058.

[2] Berridge MJ. Calcium signalling remodelling and disease. Biochem Soc Trans, 2012,40 (2): 297-309.

[3] Hogan PG. The STIM1-ORAI1 microdomain. Cell Calcium, 2015,58(4): 357-367.

[4] HouXj, LPedii, MM Diver,et al. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. Science, 2012,338(6112): 1308-1313.

[5] Xue Yang, Hao Jin, Xiangyu Cai, et al. Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). Proc. Natl. Acad. Sci, 2012,109(15): 5657-5662.

[6] Tanwar J, Motiani RK. Role of SOCE architects STIM and Orai proteins in Cell Death. Cell Calcium, 2018,69:19-27.

[7] Feske S,Gwack Y， Prakriya M et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature, 2006,441(7090): 179-185.

[8] Völkers M, Dolatabadi N, Gude N, et al. Orai1 deficiency leads to heart failure and skeletal myopathy in zebrafish. J Cell Sci, 2012,15(125Pt 2): 287-294.

[9] Chen YF, Hsu KF, Shen MR. The store-operated Ca(2+) entry-mediated signaling is important for cancer spread. Biochim Biophys Acta, 2016,1863(6): 1427-1435.

[10] Jardin I, Rosado JA. STIM and calcium channel complexes in cancer. Biochim Biophys Acta, 2016,1863(6): 1418-1426.

[11] Xie J,Pan H, Yao J, et al. SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives. Int J Cancer, 2016,138(9): 2067-2077.

[12] Vashisht A, Trebak M, Motiani RK. STIM and Orai proteins as novel targets for cancer therapy. J Physiol Cell Physiol, 2015,309(7): C457-469.

[13] Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. Chem Rev, 2015,115(19): 10938-10966.

[14] Goddard AD, Dijkman PM, Adamson RJ, et al. Reconstitution of membrane proteins: a GPCR as an example. Methods Enzymol, 2015,556:405-424.

[15] Verchère A, Broutin I, Picard M. Reconstitution of Membrane Proteins in Liposomes. Methods Mol Biol, 2017,1635:259-282.

[16] JørgensenIL, KemmerGC, PomorskiTG. Membrane protein reconstitution into giant unilamellar vesicles: a review on current techniques. Eur Biophys J, 2017,46(2): 103-119.

[17] Marek M, Milles S, Schreiber G, et al .The yeast plasma membrane ATP binding cassette (ABC) transporter Aus1: purification, characterization, and the effect of lipids on its activity. J Biol Chem, 2011,286(24): 21835–21843.

[18] Thompson JL, Shuttleworth TJ. How many Orai's does it take to make a CRAC channel? Scientific Reports, 2013,3:1961.